

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平5-211884

(43) 公開日 平成5年(1993)8月24日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 19/26		7432-4B		

審査請求 未請求 請求項の数1(全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平4-17206	(71) 出願人	391003451 丸金醤油株式会社 香川県小豆郡内海町苗羽甲1850番地
(22) 出願日	平成4年(1992)2月3日	(72) 発明者	塚田 陽二 京都府京都市伏見区深草出羽屋敷町23 フ ァミール伏見B904
		(72) 発明者	太田 泰弘 京都府宇治市五ヶ庄一番割59の1 壱番館 501号
		(74) 代理人	弁理士 三枝 英二 (外4名)

(54) 【発明の名称】 N-アセチルノイラミン酸の製造法

(57) 【要約】

【構成】 アルカリ性条件下、N-アセチルグルコサミンおよびピルビン酸の存在下にN-アセチルノイラミン酸リアーゼを作用させることを特徴とするN-アセチルノイラミン酸の製造法。

【効果】 N-アセチルノイラミン酸を簡易かつ実用的な方法で製造できるようになった。

(2)

特開平5-211884

1

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アルカリ性条件下、N-アセチルグルコサミンおよびビルビン酸の存在下にN-アセチルノイラミン酸リアーゼを作用させることを特徴とするN-アセチルノイラミン酸の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、N-アセチルノイラミン酸の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】 N-アセチルノイラミン酸は、シアル酸類で最も普遍的な物質であり、生体の組織、体液、分泌液等に広く分布し、赤血球凝集、細胞間認識、血清蛋白質の代謝回転等に関与することが知られている重要な物質である。

【0003】 この様な、重要物質であるN-アセチルノイラミン酸は、従来、大腸菌の夾膜多糖の加水分解により製造されている他、ウミツバメの巣、鶏卵及び牛乳などの天然物の加水分解によっても製造されている。

【0004】 上記のような天然物を製造原料とする方法は、製造原料の絶対量が限られているため、年々需要の増加しているN-アセチルノイラミン酸を大量に供給することが困難であること、天然物の加水分解後の他の夾雑物からのN-アセチルノイラミン酸の分離精製が容易でないこと及び製造コストが高つくこと等の問題点を有しており、N-アセチルノイラミン酸の安価な大量生産技術は未開発の状況にある。

【0005】 上記の問題を解決するため、酵素を用いる合成法が種々検討されている。

【0006】 例えば、キム (Kim) ら [ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー (J. Am. Chem. Soc.), 110, 6481~6486 (1988)] は、N-アセチルマンノサミンとビルビン酸とをN-アセチルノイラミン酸リアーゼの存在下に反応させることにより、N-アセチルノイラミン酸を製造する方法を報告している。しかし、この方法は、高価で大量の入手が困難なN-アセチルマンノサミンを原料として使用している点で実用性に欠ける。

【0007】 N-アセチルマンノサミンは、N-アセチルグルコサミンをpH12程度の強アルカリ性条件下で異性化させて製造することもできるが [サイモン (Simon) ら、ジャーナル・オブ・アメリカン・ケミカル・ソサエティー (J. Am. Chem. Soc.), 110, 7159~7163 (1988) 参照]、この方法では平衡時のN-アセチルグルコサミンとN-アセチルマンノサミンの比率が、N-アセチルグルコサミン：N-アセチルマンノサミン=3：1であり、N-アセチルマンノサミンの割合が小さいためその単離操作が容易でない。

【0008】 N-アセチルグルコサミンとビルビン酸と

2

をN-アセチルノイラミン酸リアーゼ及びエピメラーゼの存在下に反応させてN-アセチルノイラミン酸を得る方法も提案されている [例えば、キーグル (Kiegl) ら、Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 30, 827~828 (1991) 参照]。この方法では、N-アセチルグルコサミンがエピメラーゼの作用により順次N-アセチルマンノサミンに変換され、次いでこのN-アセチルマンノサミンがN-アセチルノイラミン酸リアーゼの作用を受けてN-アセチルノイラミン酸に変換される。しかしながら、N-アセチルグルコサミンを異性化するエピメラーゼの入手が困難であり、しかもN-アセチルグルコサミンのN-アセチルノイラミン酸への変換率が25%と低く、この方法も実用的であるとはいえない。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、N-アセチルノイラミン酸の簡易かつ実用的な製造法を提供することを目的とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、上記課題を達成するために鋭意検討を重ねた結果、従来は酵素が失活することを避けるため、およびN-アセチルノイラミン酸リアーゼの至適pH (7.7) から離れるために使用されていなかったアルカリ性、即ち、高いpH領域でN-アセチルグルコサミンとビルビン酸とをN-アセチルノイラミン酸リアーゼの存在下に反応させると、基質であるN-アセチルグルコサミン及びビルビン酸の保護効果により酵素の失活が抑制され、N-アセチルグルコサミンが効果的にN-アセチルノイラミン酸に変換されることを見出した。

【0011】 即ち、本発明は、アルカリ性条件下、N-アセチルグルコサミンおよびビルビン酸の存在下にN-アセチルノイラミン酸リアーゼを作用させることを特徴とするN-アセチルノイラミン酸の製造法を提供するものである。

【0012】 本発明の製造法において、アルカリ性条件下とは、反応液のpHが通常8~12程度、好ましくは9~12程度、より好ましくは10~12程度、最も好ましくは10~11程度である。反応液のpHが低くなり過ぎるとN-アセチルグルコサミンからN-アセチルマンノサミンへの変換がほとんど或いは全く起こらないため反応は進行せず、反応液のpHが高くなり過ぎるとN-アセチルノイラミン酸リアーゼが失活するため反応の収率が低下する。反応温度は、10~80℃程度、好ましくは20~50℃程度であり、反応時間は30分~240時間程度、好ましくは20時間~120時間程度である。反応は、静置または攪拌状態で行う。

【0013】 反応液中の各成分の濃度としては、以下の通りである。

【0014】 (1) N-アセチルグルコサミンの使用量

(3)

特開平5-211884

3

は特に制限されず、飽和溶解度までのいずれの濃度でも使用できるが、好ましくは1~20W/V%程度、より好ましくは10~20W/V%程度使用される。

【0015】(2) ビルビン酸の使用量は特に制限されず、飽和溶解度までのいずれの濃度でも使用できるが、好ましくは1~20W/V%程度、より好ましくは10~20W/V%程度使用される。

【0016】(3) N-アセチルノイラミン酸リアーゼの使用量は特に制限されず、基質の量に応じて広い範囲から選択できるが、好ましくは反応液1ml当たり0.01U以上、より好ましくは0.1U~100U程度、最も好ましくは1U~50U程度である。

【0017】基質であるN-アセチルグルコサミンおよびビルビン酸の濃度が低すぎると生産されるN-アセチルノイラミン酸の絶対量が少なくなり、基質であるN-アセチルグルコサミンおよびビルビン酸の濃度が高すぎると反応終了時のN-アセチルノイラミン酸の割合が低下するため精製が困難となる。

【0018】N-アセチルノイラミン酸リアーゼの使用量が少なすぎると反応に長時間を要することになり、N-アセチルノイラミン酸リアーゼの使用量が多すぎても反応時間、収率は変わらず不経済である。

【0019】反応液のpHをアルカリ性に調整する方法としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化リチウム等のアルカリ金属水酸化物、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等のアルカリ土類金属水酸化物、炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、炭酸水素ナトリウム、炭酸水素カリウム等のアルカリ金属炭酸塩または炭酸水素塩、アンモニアなどのアルカリ性の物質を目的とするpHの調整に必要な量だけ添加するか、またはリン酸緩衝液、トリス-塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、ペロナール塩酸緩衝液、グッド緩衝液、ジエタノールアミン塩酸緩衝液などのアルカリ性の緩衝液の使用により行うことができる。

【0020】N-アセチルグルコサミンは、遊離塩基及び塩酸、硫酸等の塩のいずれの形態でも使用することができる。

【0021】ビルビン酸は、遊離の酸及びナトリウム、カリウム等の塩のいずれの形態でも使用することができる。

【0022】N-アセチルノイラミン酸リアーゼは、動物起源及び植物起源のいずれの由来の酵素も用いることができ、酵素の純度にも余り影響されない。

【0023】本発明の方法により生成するN-アセチルノイラミン酸は、公知の手段により容易に反応液から分離精製できる。例えば、イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製後、濃縮し、有機溶媒中で結晶体を得ることができる。

【0024】

【発明の効果】本発明の方法によれば、基質の酵素保護

4

作用により従来では酵素が失活するとされているアルカリ性条件下で反応を行うことができるため、以下のような優れた効果が達成される。

【0025】(1) 安価で大量入手が可能なN-アセチルグルコサミンを原料とし、高い基質濃度で反応が行えるため、N-アセチルノイラミン酸の大量合成が可能となった。

【0026】(2) 1段階で反応が進行するので、製造工程の簡略化が図れるようになった。

(3) N-アセチルグルコサミンがアルカリ性条件下でN-アセチルマンノサミンに異性化するため、エビメラゼを使用する必要がない。

【0027】(4) 反応液のpH、酵素量、基質濃度等の条件を適切に選択すると、対N-アセチルグルコサミン50%以上(モル比率)という高収率でN-アセチルノイラミン酸を製造することができる。

【0028】

【実施例】以下、実施例および比較例を用いて本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0029】

【実施例1】

#### \*N-アセチルノイラミン酸の製造

水にN-アセチルグルコサミン18gおよびビルビン酸18gを溶解し、この溶液を1N-水酸化ナトリウム水溶液を用いてpH10.5に調整後、これにN-アセチルノイラミン酸リアーゼ2000Uを加えて全量を100mlとし、30℃で48時間反応させた。HPLCによる定量によれば、反応液中のN-アセチルノイラミン酸量は13gであり、使用したN-アセチルグルコサミンに対する変換率は約51%であった。

【0030】Dowex 1(登録商標、ダウケミカル株式会社製)によるイオン交換クロマトグラフィーにより反応生成物を単離し、濃縮後、常法に従いN-アセチルノイラミン酸の針状結晶を10g得た。

【0031】

【実施例2】100mMリン酸緩衝液(pH10.0)にN-アセチルグルコサミン100gおよびビルビン酸200gを溶解し、N-アセチルノイラミン酸リアーゼ15000Uを加えて全量を1リットルとし、35℃で120時間反応させた。反応液中のN-アセチルノイラミン酸の量は56gであり、使用したN-アセチルグルコサミンに対する変換率は約40%であった。

【0032】Dowex 1(登録商標、ダウケミカル株式会社製)によるイオン交換クロマトグラフィーにより反応生成物を単離し、濃縮後、常法に従いN-アセチルノイラミン酸の針状結晶を約42g得た。

【0033】

【実施例3~23及び比較例1】N-アセチルグルコサミンおよびビルビン酸の濃度、N-アセチルノイラミン

5 酸リアーゼの濃度、反応時間並びにリン酸緩衝液のpHを各々変更した以外は実施例2と同様な条件下で反応を行った。  
6 \*【0034】結果を、以下の第1表および第2表に示す。  
\*【0035】

第1表

*N-アセチルノイラミン酸リアーゼ濃度：10U/ml					
実施例	pH	基質濃度		NANAの濃度	
		(g/100ml)		(mg/ml)	
		GlcNAc	Pyr-Na	1日反応後	5日反応後
3	8.0	18	18	0	1
4	9.0	18	18	1	3
5	9.5	18	18	2	7
6	10.0	18	18	19	50
7	10.5	18	18	55	130
8	11.0	18	18	30	60
9	9.0	4.5	4.5	0	1
10	9.5	4.5	4.5	1	2
11	10.0	4.5	4.5	4	11
12	10.5	4.5	4.5	9	20
13	11.0	4.5	4.5	2	3
比較例1	7.5	18	18	0	0

第2表

*N-アセチルノイラミン酸リアーゼ濃度：1U/ml					
実施例	pH	基質濃度		NANAの濃度	
		(g/100ml)		(mg/ml)	
		GlcNAc	Pyr-Na	1日反応後	5日反応後
14	9.0	18	18	0	1
15	9.5	18	18	1	3
16	10.0	18	18	2	15
17	10.5	18	18	7	26
18	11.0	18	18	2	6
19	9.0	4.5	4.5	0	1
20	9.5	4.5	4.5	1	2
21	10.0	4.5	4.5	3	9
22	10.5	4.5	4.5	6	13
23	11.0	4.5	4.5	1	1

なお、第1表および第2表中の略号の意味は、以下の通りである。  
【0036】\*NANA：N-アセチルノイラミン酸  
\*GlcNAc：N-アセチルグルコサミン  
\*Pyr-Na：ピルビン酸ナトリウム  
上記第1表および第2表の結果から、本発明の方法によれば、N-アセチルグルコサミンから1段階でN-アセチルノイラミン酸に高い割合で変換できることが明かとなった。  
【0037】  
【実施例24】  
\*N-アセチルノイラミン酸リアーゼの安定性  
100mMリン酸緩衝液(pH10.0)にN-アセチルノイラミン酸リアーゼ100U、N-アセチルグルコサミン1.8gおよびピルビン酸ナトリウム1.8gを  
40 加えて全量を10mlとし、35℃で16時間反応させた。反応後のN-アセチルノイラミン酸リアーゼの残存率を、反応液を100倍量の50mMリン酸緩衝液(pH7.5)に透析後、基質(N-アセチルノイラミン酸)と反応し、生成するN-アセチルマンノサミンを比色定量することにより求めたところ100%であった。  
【0038】  
【実施例25~43】N-アセチルグルコサミンおよびピルビン酸の濃度、N-アセチルノイラミン酸リアーゼの濃度並びにリン酸緩衝液のpHを各々変更した以外は実施例24と同様な条件下でN-アセチルノイラミン酸リアーゼの安定性を調べた。  
【0039】  
【比較例2】N-アセチルグルコサミンおよびピルビン酸ナトリウムを添加しないことを除いては実施例24と  
50

(5) 特開平5-211884

7  
同様の条件で、N-アセチルノイラミン酸リアーゼの安定性を調べた。  
【0040】  
【比較例3～11】N-アセチルノイラミン酸リアーゼの濃度およびリン酸緩衝液のpHを各々変更した以外は\*

8  
\*比較例2と同様な条件下でN-アセチルノイラミン酸リアーゼの安定性を調べた。  
【0041】結果を、以下の第3表および第4表に示す。  
【0042】

第 3 表

\*N-アセチルノイラミン酸リアーゼ濃度：10 U／ml

実施例又は比較例	pH	基質濃度 (g／100ml)	N-アセチルノイラミン酸	
		G l c N A c	P y r - N a	リアーゼの残存率 (%)
実施例 2 4	9 . 0	1 8	1 8	1 0 0
実施例 2 5	9 . 5	1 8	1 8	1 0 0
実施例 2 6	1 0 . 0	1 8	1 8	1 0 0
実施例 2 7	1 0 . 5	1 8	1 8	8 0
実施例 2 8	1 1 . 0	1 8	1 8	2 2
実施例 2 9	9 . 0	4 . 5	4 . 5	1 0 0
実施例 3 0	9 . 5	4 . 5	4 . 5	1 0 0
実施例 3 1	1 0 . 0	4 . 5	4 . 5	1 0 0
実施例 3 2	1 0 . 5	4 . 5	4 . 5	8 0
実施例 3 3	1 1 . 0	4 . 5	4 . 5	1 0
比較例 2	9 . 0	0	0	1 0 0
比較例 3	9 . 5	0	0	1 0 0
比較例 4	1 0 . 0	0	0	2 0
比較例 5	1 0 . 5	0	0	0
比較例 6	1 1 . 0	0	0	0

第 4 表

\*N-アセチルノイラミン酸リアーゼ濃度：1U/ml

実施例又は比較例	pH	基質濃度 (g/100g)		N-アセチルノイラミン酸
		G l c N A c	P y r - N a	リアーゼの残存率 (%)
実施例34	9. 0	18	18	100
実施例35	9. 5	18	18	100
実施例36	10. 0	18	18	97
実施例37	10. 5	18	18	70
実施例38	11. 0	18	18	30
実施例39	9. 0	4. 5	4. 5	100
実施例40	9. 5	4. 5	4. 5	100
実施例41	10. 0	4. 5	4. 5	98
実施例42	10. 5	4. 5	4. 5	60
実施例43	11. 0	4. 5	4. 5	8
比較例7	9. 0	0	0	100
比較例8	9. 5	0	0	98
比較例9	10. 0	0	0	15
比較例10	10. 5	0	0	0
比較例11	11. 0	0	0	0

上記第3表および第4表の結果から、基質であるN-アセチルグルコサミンおよびヒルビン酸の存在により、より広いpH範囲で不安定なN-アセチルノイラミン酸リアーゼの安定化が図れることが明かとなった。  
【0043】